

## PATENT ABSTRACTS OF JAPAN

(11)Publication number : 01-297553

(43)Date of publication of application : 30.11.1989

(51)Int.Cl.

G01N 30/88

B01D 15/08

B01J 20/02

C07K 3/20

C12N 9/00

C12P 21/00

G01N 30/26

G01N 30/48

(21)Application number : 63-127985

(71)Applicant : ASAHI OPTICAL CO LTD

(22)Date of filing : 25.05.1988

(72)Inventor : HIRAIDE TSUNEO

## (54) SEPARATION OF PROTEIN AND PHYSIOLOGICALLY ACTIVE MATERIAL BY USING LIQUID CHROMATOGRAPHY

## (57)Abstract:

PURPOSE: To stabilize sepn. by holding a sample by using a buffer soln. which does not contain phosphate and has pH in a 3W12 range, then eluting a soln. added with the phosphate to the buffer soln. as an eluate within the range of the optimum pH.

CONSTITUTION: The sample soln. prepd. by dissolving the sample into the buffer soln. which does not contain the phosphate and has the pH in the 3W12 range is first passed in a column in which a packing material is packed to hold the sample in the packing material. The sample component held in the packing material is then eluted by using the soln. prepd. by adding and dissolving the phosphate in the buffer soln. which does not contain the phosphate and has the pH in the 3W12 range. The sepn. is executed by using a step method or gradient method and by adding phosphoric acid of a high concn. up to about 400mM to the soln. The buffer soln. which does not denature or deactivate protein and physiologically active material at the optimum use pH range and the optimum use concn. is selected and the pH at which the buffer power of said buffer soln. is high is used. The stable sepn. is thereby enabled and this method is applicable to sepn. and refining of a wide range of materials.

## LEGAL STATUS

[Date of request for examination]

[Date of sending the examiner's decision of rejection]

[Kind of final disposal of application other than the examiner's decision of rejection or application converted registration]

[Date of final disposal for application]

[Patent number]

[Date of registration]

[Number of appeal against examiner's decision of rejection]

[Date of requesting appeal against examiner's

decision of rejection]  
[Date of extinction of right]

Copyright (C); 1998,2003 Japan Patent Office

## ⑫ 公開特許公報(A) 平1-297553

⑤Int. Cl. 4	識別記号	庁内整理番号	⑬公開 平成1年(1989)11月30日
G 01 N 30/88		E-7621-2G	
B 01 D 15/08		6953-4D	
B 01 J 20/02		A-6939-4G	
C 07 K 3/20		8318-4H	
C 12 N 9/00	1 0 1	7823-4B	
C 12 P 21/00		B-6712-4B	
G 01 N 30/26		A-7621-2G	
30/48		C-7621-2G	審査請求 未請求 請求項の数 2 (全4頁)

⑭発明の名称 液体クロマトグラフィーを用いた蛋白質及び生理活性物質の分離方法

⑮特 願 昭63-127985

⑯出 願 昭63(1988)5月25日

⑰発 明 者 平 出 恒 男 東京都板橋区前野町2丁目36番9号 旭光学工業株式会社 内

⑱出 願 人 旭光学工業株式会社 東京都板橋区前野町2丁目36番9号

⑲代 理 人 弁理士 三浦 邦夫 外1名

## 明 細 書

## 1. 発明の名称

液体クロマトグラフィーを用いた蛋白質及び生理活性物質の分離方法

## 2. 特許請求の範囲

## 1. 一般式:



(式中AはCa、Pb、Sn、Mn、Fe、Ba、Ni、Mg、Cd、Zn、Srなどの2価の金属のうちの1種以上を示し、MはP、As、V、S及びSiのうちの1種以上を示し、Xはハロゲン原子又は水酸基を示す)で表わされるアパタイト構造を有する充填剤を充填したカラムを用いて液体クロマトグラフィーにより蛋白質及び生理活性物質を分離するに当たり、リン酸塩を含まないpH3~12の範囲の緩衝液を用いて試料を保持させ、該緩衝液にリン酸塩を添加した溶液を溶離液として用いて該緩衝液の最適pH範囲内で溶離を行うことを特徴とする液体クロマトグラフィーを用いた蛋白質及び生理活性物質の分離方法。

2. リン酸塩を含まない緩衝液として、トリス緩衝液、ドータイト・グッド緩衝液又は酢酸緩衝液を用いる請求項1記載の分離方法。

## 3. 発明の詳細な説明

## 「利用分野」

本発明は、液体クロマトグラフィーを用いて蛋白質及び酵素、核酸などの生理活性物質を分離する方法に関する。

## 「従来技術及びその問題点」

従来、液体クロマトグラフィー用充填剤としては、シリカゲルや高分子ゲルが一般的に使用されてきたが、近年、アパタイトの優れた生体親和性を利用して、蛋白質、核酸、糖、配糖体などの生体高分子を分離する液体クロマトグラフィーにアパタイトが用いられるようになった。

アパタイトを充填剤としたカラムを用いて液体クロマトグラフィーを行う場合には、通常10mMリン酸緩衝液をカラムに通液しながら試料を保持させた後、高濃度(400mM)リン酸緩衝液を用いてステップ法あるいはグラジエント法で溶離す

る。その際、リン酸緩衝液の使用pH範囲は、6.5～7.5程度であり、一般的には6.8である。

しかしながら、このような従来方法では、低濃度のリン酸緩衝液で溶出してしまい、カラムに保持されない場合があり、また、リン酸濃度を1mM程度に下げると、緩衝能が低下し、安定した分離を行うことができなくなる。さらに、蛋白質や生理活性物質を含む試料をクロマトグラフィー分離する場合には、使用pH範囲で蛋白質や生理活性物質が変性又は失活してしまうことがある。また、pH6.5～7.5のリン酸緩衝液に難溶性の物質の分離には、アパタイトカラムを使用できないという問題点もある。

#### 「発明の目的」

本発明は、蛋白質及び生理活性物質を変性又は失活せずにアパタイトカラムを用いて液体クロマトグラフィーにより分離しうる蛋白質及び生理活性物質の分離方法を提供することを目的とする。

#### 「発明の構成」

本発明による液体クロマトグラフィーを用いた

$\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})\text{Cl}$ 、 $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6\text{Cl}_2$ 、 $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})\text{F}$ 、 $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6\text{F}_2$ 、さらにこれらのアパタイトのCa原子の一部又は全部がPb、Sn、Mn、Fe、Baなどの2価の金属で置換されたものなどが挙げられる。

本発明の方法を実施するには、まず、上記のような充填剤を充填したカラムに、リン酸塩を含まないpH3～12の範囲の緩衝液中に試料を溶解した試料溶液を通液することにより充填剤に試料を保持させる。ここで、リン酸塩を含まない緩衝液としては、例えば、トリス塩酸緩衝液やトリスマレイン酸緩衝液のようなトリス緩衝液、ドータイトMES、ビスートリス、MOPSのような各種のドータイト・グッド緩衝液、酢酸-酢酸ナトリウムあるいは酢酸アンモニウムのような酢酸緩衝液などが挙げられるが、蛋白質及び生理活性物質を変性したり、失活したりせず、リン酸塩を含まないpH3～12の範囲の緩衝液であれば、各種の緩衝液を使用することができる。

次に、充填剤に保持された試料成分を溶離する

蛋白質及び生理活性物質の分離方法は、一般式(1)：



(式中AはCa、Pb、Sn、Mn、Fe、Ba、Ni、Mg、Cd、Zn、Srなどの2価の金属のうちの1種以上を示し、MはP、As、V、S及びSiのうちの1種以上を示し、Xはハロゲン原子又は水酸基を示す)で表わされるアパタイト構造を有する充填剤を充填したカラムを用いて液体クロマトグラフィーにより蛋白質及び生理活性物質を分離するに当たり、リン酸塩を含まないpH3～12の範囲の緩衝液を用いて試料を保持させ、該緩衝液にリン酸塩を添加した溶液を溶離液として用いて緩衝液の最適pH範囲内で溶離を行うことを特徴とする。

本発明の方法は、上記のように、一般式(1)で表わされるアパタイト構造を有する充填剤を充填したカラムを用いる。本発明に使用しうる一般式(1)で表わされるアパタイト構造を有する充填剤としては、例えば $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$ 、

が、本発明の方法において溶離液としては、上記のリン酸塩を含まないpH3～12の範囲の緩衝液にリン酸塩を添加・溶解した溶液を用いる。この溶離は、ステップ法あるいはグラジエント法で実施することができ、400mM程度まで高濃度のリン酸塩を添加して実施することができる。

本発明の方法を実施する際には、使用最適pH範囲及び使用最適濃度で蛋白質及び生理活性物質の変性や失活を起こさない緩衝液を選択し、その緩衝液の緩衝能の高いpHで用いて実施する。

#### 発明の実施例」

次に、実施例により本発明をさらに詳しく説明するが、本発明はこれに限定されるものではない。  
実施例1

平均粒径2μm%のハイドロキシアパタイトから成る充填剤を内径7.5mm、長さ100mmのステンレスカラムに充填し、10mMトリス塩酸緩衝液(pH8.0)を通液しながらウシ血清アルブミン(BSA)、リゾチーム及びチトクロームcを充填剤に保持させ、次に0～400mMのリン酸ナト

リウムを上記のトリス-塩酸緩衝液に溶解した溶液を移動相とし、1.0 ml/分の流速で30分間、リニアグラジエント法によりBSA、リゾチーム及びチトクロームcの分離を行ったところ、第1図に示すようなクロマトグラムが得られた。

図面において、1はBSAのピーク、2はリゾチームのピーク、3及び4はチトクロームcのピークを示す。

#### 実施例2

10mMトリス-塩酸緩衝液の代わりに、10mMドータイトMOPS-NaOH緩衝液(pH6.8)を用いた以外は、実施例1と同様にして同じ試料を分離したところ、第2図に示すクロマトグラムが得られた。このクロマトグラムは、実施例1で得たものに比べてBSA、リゾチーム及びチトクロームの各成分の分離時間が多少、遅くなっているが、実施例1より高い分離能を示した。

#### 比較例1

10mMトリス-塩酸緩衝液の代わりに、10mMリン酸緩衝液(pH6.8)を用いた以外は、実施例

1と同様にして同じ試料を分離したところ、第3図に示すクロマトグラムが得られた。このクロマトグラムでは、第1図及び第2図のクロマトグラムに比べてBSAのピークがシャープでなく、早く溶離してしまったことが判る。

#### 「発明の効果」

本発明の方法によれば、リン酸塩を含まない緩衝液を用いて試料を固定相に保持させるため、低濃度のリン酸塩で溶出する試料でもカラムに保持させることができ、緩衝液の緩衝能の高いpH範囲での保持及び溶離を行うことができ、安定した分離が可能である。また、試料を固定相に保持させる際に、試料中の蛋白質や生理活性物質の変性や失活を起こさない緩衝液の種類、pH及び濃度を選択することができるため、本発明方法は広範な物質の分離・精製に適用することができる。さらに本発明の方法は、リン酸緩衝液以外の緩衝液を用いるので、pH6.5～7.5程度のリン酸緩衝液に難溶であるためにアパタイトカラムを使用できなかった試料の分離・精製に適用することができる。

また、試料を分離・精製する前処理で用いていた緩衝液を用いて本発明の方法を実施することもでき、これにより精製工程の簡略化を図ることができる。

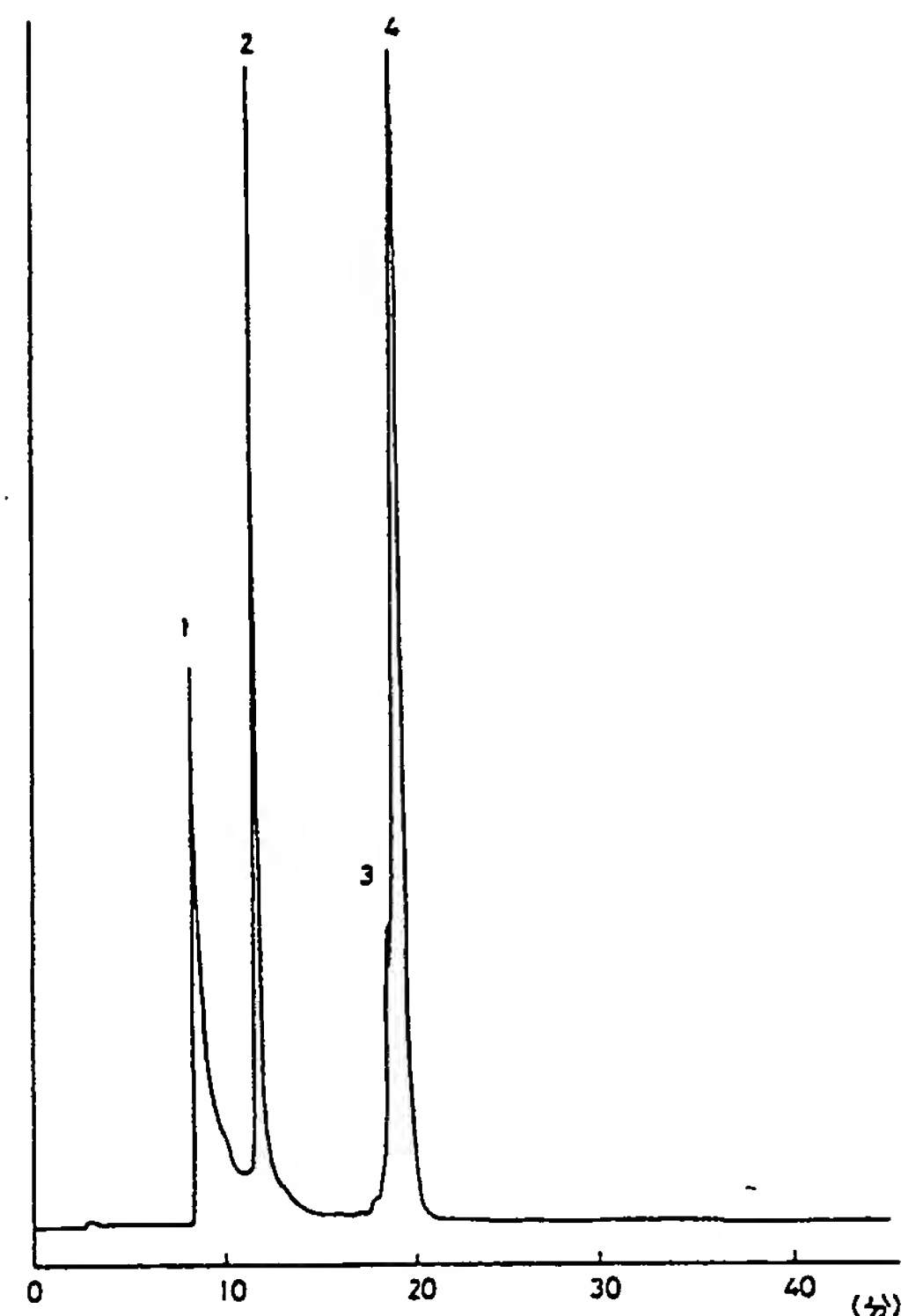
#### 4. 図面の簡単な説明

第1図は実施例1で得られたクロマトグラム、第2図は実施例2で得られたクロマトグラム、第3図は比較例1で得られたクロマトグラムを示す。

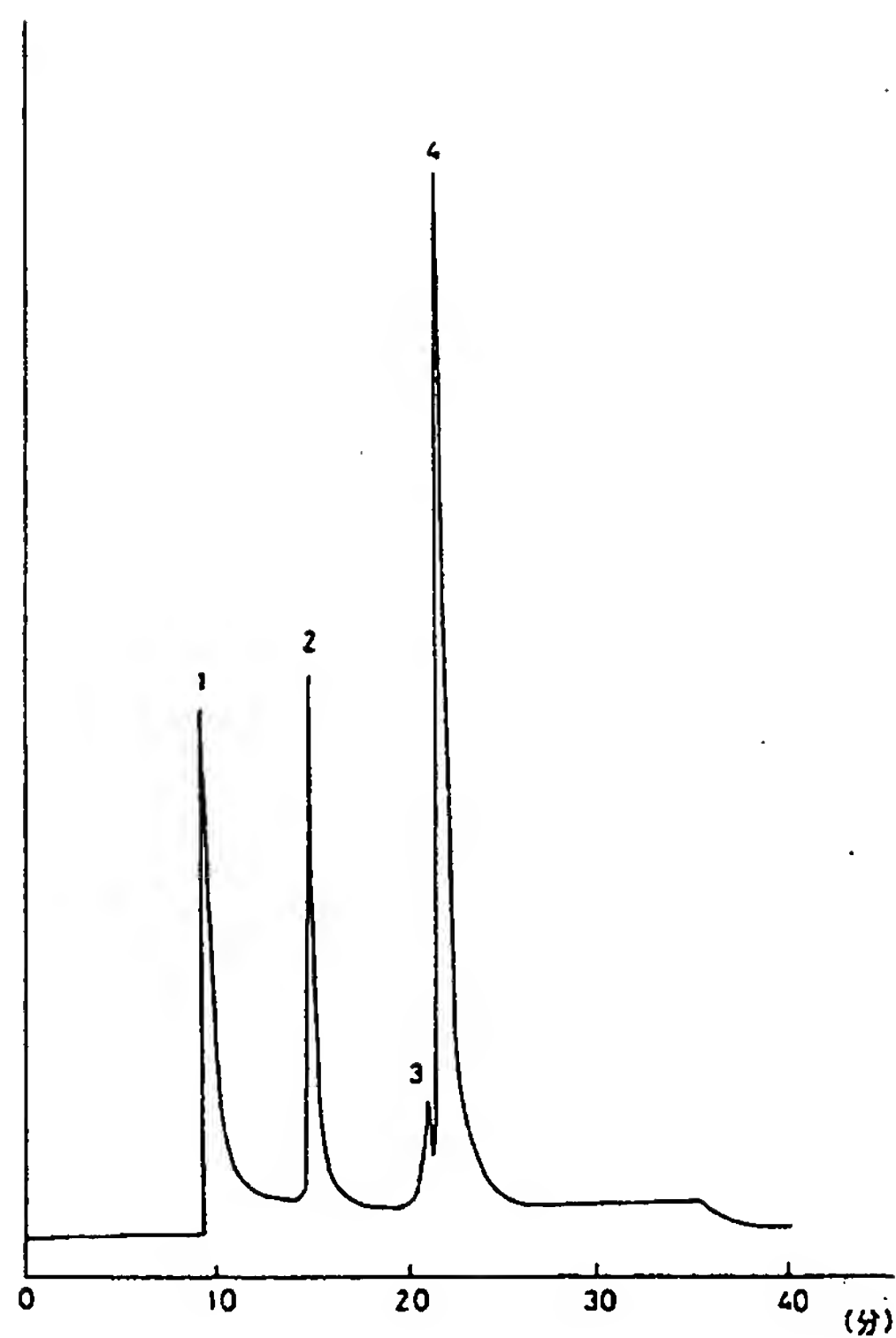
##### 符号の説明

- 1・・・BSAのピーク
- 2・・・リゾチームのピーク
- 3及び4・・・チトクロームcのピーク

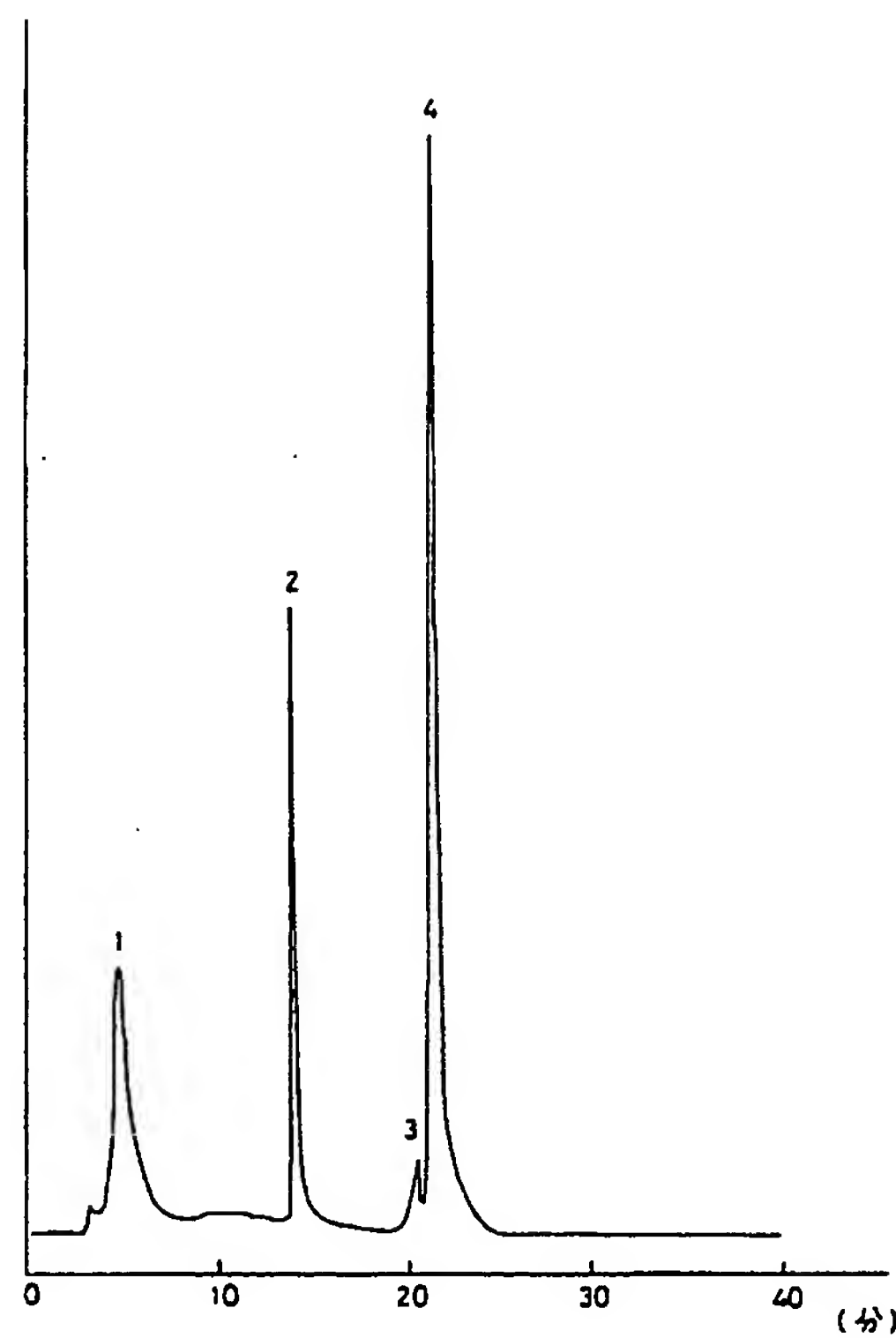
特許出願人 旭光学工業株式会社  
代理人 弁理士 三浦邦夫  
同 弁理士 笹山善美



第1図



第 2 図



第 3 図